

Express Mail Label No. EL973657804US

Docket No.: 100717-606/Bayer 10267-WCG

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICATION NO. : To Be Assigned
APPLICANT : Dr. Gregor DUDZIAK et al
FILED : Herewith
FOR : Device and Method for Preparative Electrophoresis
ART UNIT : To Be Assigned
EXAMINER : To Be Assigned

November 13, 2003

Commissioner for Patents
PO Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

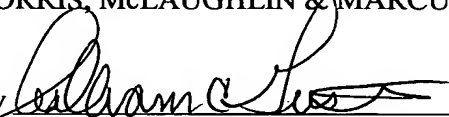
SIR:

Appended hereto is a certified copy of Priority Document 102 53 483.7 filed
November 18, 2002.

Applicant requests that this document be made of record in the above identified
application.

Respectfully submitted,

NORRIS, McLAUGHLIN & MARCUS, P.A.

By 

William C. Gerstenzang

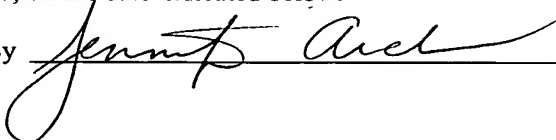
Reg. No. 27,552

220 East 42nd Street - 30th Floor
New York, New York 10017
Tel.: (212) 808-0700

CERTIFICATE OF EXPRESS MAILING

I hereby certify that the foregoing Transmittal of Priority Document is being deposited with the
United States Postal Service as express mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents,
PO Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date indicated below:

Date: November 13, 2003

By 



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 53 483.7

Anmeldetag: 18. November 2002

Anmelder/Inhaber: Bayer AG, Leverkusen/DE

Bezeichnung: Vorrichtung und Verfahren zur präparativen Elektrophorese

IPC: B 01 D 57/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Eberl

Vorrichtung und Verfahren zur präparativen Elektrophorese

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung der Membranelektrophorese mittels Mikro- oder Ultrafiltrationsmembranen. Dabei wird
5 der elektroosmotische Fluss, der sich in den Membranporen ausbildet, durch Drucküberlagerung reduziert oder kompensiert.

Der Einsatz der Elektrophorese als präparative Trenntechnik wird seit den 50er Jahren untersucht.

10

Bei der kontinuierlichen Freifluss-Elektrophorese strömt eine Lösung in eine Elektrophoresekammer ein und wird zwischen zwei Elektroden im elektrischen Feld separiert. Beim Austritt aus dem Elektrophoresemodul wird der Flüssigkeitsstrom in
15 eine Vielzahl von Fraktionen aufgeteilt, die die zu trennenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. Obwohl diese Technik im Labormaßstab zu guten Selektivitäten führt, ist eine Maßstabsvergrößerung nur in engen Grenzen möglich. Als Hauptproblem gilt die Erwärmung der Lösung im elektrischen Feld sowie die daraus resultierenden Dispersionsphänomene wie etwa Wärmekonvektion. Mit kommerziell erhältlichen Freifluss-Elektrophorese-Geräten können Produktivitäten von einigen Gramm Produkt pro Tag erzielt werden.
20

20

Bei der Membranelektrophorese wirken semipermeable Membranen als Konvektionsbarrieren zwischen angrenzenden Kompartimenten, wobei mindestens eine gelöste Komponente im elektrischen Feld von einem Kompartiment in ein anderes wandern kann.
25

25

In ersten Veröffentlichungen wurden makroporöse Membranen, zum Beispiel Filterpapier, eingesetzt. Diese Materialien haben jedoch eine Reihe von Nachteilen: Sie weisen keinerlei Selektivität für die zu trennenden Substanzen auf (US-A-3 989 613, US-A-4 043 895) und haben darüber hinaus oft nur eine geringe mechanische und
30 chemische Stabilität. Überdies zeigen sie bereits bei Druckdifferenzen von weniger

30

als 1 kPa nicht zu vernachlässigende druckinduzierte Transmembranflüsse. Zeitlich oder örtlich variable Druckdifferenzen zwischen einzelnen Kompartimenten führen somit zu einer Rückvermischung und einer Verminderung der Trennleistung. Dieser druckinduzierte Permeatfluss wurde von Gritzner durch Verschaltung mit Ausgleichstanks verringert (US-A-4 043 895). Durch variable Füllstände regulieren sich die hydrostatischen Drücke in den beiden Strömungskanälen selbständig auf denselben Wert ein.

Spätere Patente schlagen den Einsatz von Ultrafiltrationsmembranen vor, die eine Selektivität für Makromoleküle unterschiedlicher Größe aufweisen. Die Trennleistung kann somit in der Theorie durch die Kombination der Selektivitätskriterien elektrophoretische Mobilität und Membranrückhalt deutlich verbessert werden. Außer Offenlegungsschriften ohne Ausführungs-Beispiel (DE 3 337 669 A1, DE 3 626 953 A1) wurden Batch-Versuche im Milliliter-Maßstab veröffentlicht (US-A-6 270 672).

In der Praxis wird beim Einsatz von Ultrafiltrationsmembranen jedoch eine sehr geringe Produktivität beobachtet. In den Membranporen bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus, was im elektrischen Feld zur Induktion eines elektroosmotischen Flusses führt, der die Trennkapazität negativ geladener Proteine drastisch reduziert (Galier et al., *J. Membr. Sci.* **194** [2001] 117-133).

Ist eine Protein-Spezies unter Separationsbedingungen positiv geladen, so kann die Trennung unter umgekehrter Elektroden-Polarität durchgeführt werden. In diesem Fall kann der elektroosmotische Fluss dem Proteintransport durch die Membran entgegengerichtet oder gleichgerichtet sein. Dementsprechend beobachtet man ein Ansteigen bzw. ein Absinken des Flüssigkeitsstands im Diluat-Behälter. Während im ersten Fall eine Verminderung der Produktivität erfolgt, hat der zweite Fall eine Verringerung der Trennleistung zur Folge, da Proteine mit niedriger Mobilität, die im Diluat verbleiben sollen, konvektiv durch die Membran transportiert werden können.

Durch den Ausgleich hydrostatischer Druckunterschiede im Modul, wie etwa in US-A-4 043 895 beschrieben, können Flüssigkeitsströme durch die Separationsmembranen also nicht ausgeglichen werden.

5 Eine Alternative zum Einsatz poröser Ultra- und Mikrofiltrationsmembranen stellt die Verwendung von Gelmembranen dar. Dieses nichtporöse Material bietet den Vorteil eines geringen elektroosmotischen Flusses. Die Selektivität der Gelmembran für Makromoleküle kann durch den Grad der Polymer-Quervernetzung beeinflusst werden (vgl. US-A-4 243 507).

10 Gelmembranen weisen jedoch auch eine Reihe von Nachteilen gegenüber porösen Membranen auf:

15 Sie besitzen einen hohen Widerstand im elektrischen Feld. Dies führt zu einem hohen Energieeintrag und damit zu starker Wärmeentwicklung im Modul.

20 Gele wie Polyacrylamid besitzen eine schlechte pH-Stabilität und lassen sich daher nicht wie herkömmliche Ultra- und Mikrofiltrationsmembranen reinigen. Hieraus ergeben sich sehr hohe Kosten für den Modulersatz, da die Reinigung bei Bearbeitung von Proteinen essentiell ist.

25 Einerseits ist der Einsatz von Ultra- und Mikrofiltrationsmembranen für die Membranelektrophorese bisher durch den elektroosmotischen Effekt limitiert. Andererseits können Gelmembranen zwar mit den genannten Nachteilen im Labormaßstab eingesetzt werden, eine Maßstabsvergrößerung scheitert jedoch an zu hohen Membrankosten und Energieeintrag.

30 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Membranelektrophorese-Verfahren unter Einsatz von Ultra- und Mikrofiltrationsmembranen zu entwickeln, das die hier genannten Nachteile nicht aufweist.

Aufgrund des elektroosmotischen Flusses, der sich in porösen Membranen ausbildet, war z.B. ein Einsatz im technischen Maßstab ($>0,5$ kg/h) bisher nicht möglich.

5 Es wurde gefunden, dass der elektroosmotische Fluss in den verwendeten Membranen und die daraus resultierenden Volumenänderungen durch Überlagerung eines geregelten hydrostatischen Druckes kompensiert werden können.

10 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Membranelektrophorese von gelösten oder dispergierten Substanzen in elektrolythaltiger Lösung unter Verwendung einer mindestens vierteiligen Trennkammer, die mindestens je einen Diluatraum, einen Konzentratraum, sowie einen Kathodenraum und einen Anodenraum mit Elektroden als Anode bzw. Kathode aufweist, wobei die einzelnen Räume durch poröse Membranen, insbesondere Ultra- oder Mikrofiltrationsmembranen voneinander getrennt sind und die Elektroden von Elektrodenspüllösung umspült werden und das
15 Diluat kontinuierlich durch den Diluatraum, bzw. das Konzentrat kontinuierlich durch den Konzentratraum geführt werden, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine im Diluat gelöste oder dispergierte Substanz mittels eines zwischen Anode und Kathode angelegten elektrischen Feldes elektrophoretisch vom Diluatraum zum Konzentratraum überführt wird, wobei zwischen dem Diluatraum und dem
20 Konzentratraum eine Druckdifferenz von mindestens 3 kPa eingestellt wird.

Bevorzugt ist ein Verfahren bei dem die Druckdifferenz zwischen Diluatraum und Konzentratzzone so eingestellt wird, dass ein Flüssigkeitsstrom durch die Separationsmembran, die Konzentratraum und Diluatraum voneinander trennt, im Wesentlichen unterbunden wird.
25

Bevorzugt wird das Verfahren in einer Trennkammer durchgeführt, die aus jeweils mehreren Diluaträumen und Konzentraträumen besteht, wobei die Diluaträume und Konzentraträume zwischen Anodenraum und Kathodenraum alternierend angeordnet
30 sind, die durch Ultra- und/oder Mikrofiltrations-Membranen voneinander getrennt sind und parallel und/oder in Reihe verbunden betrieben werden.

Vorteilhafterweise werden in einer bevorzugten Ausführung Diluatflüssigkeit, Konzentratflüssigkeit und Elektrodenpüllösung oder einzelne dieser Lösungen unabhängig voneinander temperiert, bevorzugt gekühlt.

5

Die porösen Membranen weisen insbesondere eine Porengröße von 1 bis 1000 nm auf.

10

Bevorzugt basieren die Membranen auf einem oder mehreren der folgenden Werkstoffe:

Celluloseester, Polyacrylnitril, Polyamid, Polyether, Polyethersulfon, Polypropylen, Polysulfon, Polyvinylalkohol, Polyvinylidenfluorid oder Aluminiumoxid, Siliciumoxid, Titanoxid, Zirkonoxid sowie Mischkeramiken aus den oben genannten Oxiden.

15

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem Anodenraum und Kathodenraum unabhängig voneinander mit Elektrodenpüllösung durchspült werden.

20

Die für die Diluatlösung, die Konzentratlösung und Elektrodenpüllösung verwendeten Elektrolyte enthalten bevorzugt eine Kombination aus schwachen Säuren und schwachen Basen, schwachen Säuren und starken Basen oder starken Säuren und schwachen Basen.

25

Besonders bevorzugt enthalten die Elektrolyte eine oder mehrere der folgenden Verbindungen:

30

Borsäure, Phosphorsäure, N-2-(Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure, N-2-(Acetamido)iminodiessigsäure, Alanin, 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol, Ammoniak, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin, 2,2-Bis(hydroxyethyl)-iminotris(hydroxymethyl)methan, 2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure, Essigsäure, Glycin, Glycylglycin, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl]ethansulfonsäure, 3-[4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl]propansulfonsäure, Histidin, Imidazol, Milchsäure, 2-Morpholinoethansulfonsäure, 2-Morpho-

linopropansulfonsäure, Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure), N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure, N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin, Triethanolamin, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Zitronensäure.

5 Die Stromdichte bezogen auf die Membranfläche beträgt bevorzugt 10 bis 1000 A/m², insbesondere 10 bis 250 A/m².

Die Leitfähigkeit der Diluatlösung beträgt bevorzugt 0,1 mS/cm bis 40 mS/cm, insbesondere 0,1 bis 10 mS/cm.

10

Bevorzugt ist auch ein Verfahren bei dem die Leitfähigkeit der Diluatlösung während der Trennung abgesenkt wird.

15

Vorteilhaft ist weiterhin ein Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass die Diluatlösung im Anschluss an die Trennung aufkonzentriert wird, insbesondere durch Kombination mit einer Flüssigpermeation, wie zum Beispiel Mikrofiltration, Ultrafiltration, Nanofiltration oder Umkehrosmose, und dem Diluatraum wieder zugeführt wird.

20

Dem Verfahren zugänglich sind insbesondere eine oder mehrere der folgenden Substanzen: Proteine, Peptide, DNA, RNA, Oligonucleotide, Oligo- und Polysaccharide, Viren, Virenbestandteile, Zellen, Zellenbestandteile, Enantiomere und Diastereomere.

25

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Membranelektrophorese mindestens umfassend eine wenigstens vierteilige Trennkammer, die mindestens einen Diluatraum, einen Konzentratrium, sowie einen Kathodenraum und einen Anodenraum mit Elektroden als Anode bzw. Kathode aufweist, wobei die einzelnen Räume durch poröse Membranen, insbesondere durch Ultra- oder Mikrofiltrationsmembranen voneinander getrennt sind, Zuleitungen und Ableitungen für das Diluat, Zuleitungen und Ableitungen für das Konzentrat, ggf. Zuleitungen und Ableitungen

30

für die Elektrodenspüllösung sowie einer Einrichtung zur Druckregelung, mittels der zwischen Diluatraum und Konzentratraum eine Druckdifferenz insbesondere von mindestens 3 kPa erzeugbar ist.

- 5 Bevorzugt ist die Trennkammer in mehrere Diluaträume und Konzentraträume unterteilt.

10 Zwischen Anodenraum und Kathodenraum sind bevorzugt alternierend mehrere Diluaträume und Konzentraträume angeordnet, die durch poröse Restriktionsmembranen bzw. Separationsmembranen voneinander getrennt sind und die bevorzugt parallel und/oder in Reihe geschaltet sind.

15 Bevorzugt ist weiter eine Vorrichtung, in der Zuleitungen und Ableitungen für das Diluat in einem Diluatkreislauf, Zuleitungen und Ableitungen für das Konzentrat in einem Konzentratkreislauf, ggf. Zuleitungen und Ableitungen für die Elektrodenspülung in einem Elektrodenspülungskreislauf angeordnet sind.

20 Bevorzugt ist ebenfalls eine Vorrichtung, die einen Diluatkreislauf, Konzentratkreislauf und Elektrodenspülungskreislauf aufweist und insbesondere Wärmetauscher in einzelnen oder allen dieser Kreisläufe aufweist.

Der Elektrodenspülungskreislauf ist in einer bevorzugten Variante durch einen getrennten Anodenspülkreislauf und Kathodenspülkreislauf gebildet.

25 Der elektroosmotische Fluss kann durch Drucküberlagerung in einzelnen druckdichten Vorlagegefäßen kompensiert werden. Die Druckdifferenz kann einige kPa bis einige 100 kPa betragen.

30 Die Drucküberlagerung kann ebenfalls durch die Regelung der Pumpendrucke oder der Pumpen-Volumenströme aufgebaut werden.

Alternativ kann eine indirekte Regelung erfolgen, indem die Volumenflüsse an Ein- und Auslässen des Membranelektrophorese-Moduls auf identische Werte geregelt werden.

5 Die Vorrichtung eignet sich zur Aufreinigung gelöster oder disperser Substanzen in wässrigem Medium. Anwendungsbeispiele sind die Reinigung von Proteinen, Peptiden, DNA, RNA, Oligonucleotiden, Viren, Zellen sowie chiraler Moleküle.

10 Besonders geeignet ist die Methode zur Aufreinigung von Proteinen, Peptiden, Oligonukleotiden und Viruspartikeln.

Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Reinigung von Proteinen, Peptiden, DMA, RNA, Oligonucleotiden, Viren, Zellen oder chiralen Molekülen.

15

Die Erfindung kann sowohl im Batch-Betrieb als auch bei kontinuierlichem Betrieb angewendet werden.

20

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Figuren durch die Beispiele, welche jedoch keine Beschränkung der Erfindung darstellen, näher erläutert.

Es zeigen:

25

Fig. 1 das Schema einer Membranelektrophorese-Anlage mit Einrichtung zur Drucküberlagerung

Fig. 2 ein Schema eines Membranelektrophorese-Moduls (Vierer-Stack)

Beispiele

Die bei den nachfolgend beschriebenen Beispielen verwendete Anlage (Figur 1) besteht aus je einem temperierbaren Vorlagebehälter für Diluat 1, Konzentrat 2 und Elektrodenpuffer 3. Die Lösungen werden mittels Pumpen 4, 5, 6 über Vorlaufleitungen 22, 24, 26 und Rücklaufleitungen 23, 25, 27 rezirkuliert und durchströmen ein Elektrophoresetrennmodul 7. Die Drucküberlagerung im Gasraum des Diluat- und des Konzentrat-Behälters mit Stickstoff aus den Leitungen 12, 13 erfolgt mittels Nachdruckregler 8, 9. Die Nachdruckregler werden wiederum über Füllstandssonden 10, 11 geregelt.

Die Membranelektrophorese-Anlage enthält ein Modul 7a (vergleiche Fig. 2) mit jeweils vier parallelen Diluaträumen 16a und Konzentraträumen 17a-d. Die Diluat- und Konzentraträume 17 werden über Flüssigkeitsverteiler 28, 29 parallel angeströmt und durch Restriktionsmembranen 14 und Separationsmembranen 15 begrenzt. Diluat- und Konzentraträume können hier nicht gezeigte Gitternetze oder Gewebe enthalten, die als Abstandhalter zwischen den Membranen und als Strömungsbrecher fungieren. Die Elektrodenräume 18, 21 werden parallel angeströmt und durch Restriktionsmembranen 14 begrenzt. Über Elektroden 19, 20 wird ein elektrisches Feld aufgebaut. Das elektrische Feld kann wie in Figur 2 eingezeichnet oder auch entgegengesetzt aufgebaut werden.

Beispiel 1:

Die in Figur 1 gezeigte Anlage sowie das in Figur 2 skizzierte Modul 7a wurden zur Trennung von humanem Serumalbumin (HSA) und humanem Immunglobulin G (IgG) eingesetzt. Bei dem Modul 7a handelte es sich um ein modifiziertes Elektrodialysemodul der Firma Goema mit einer effektiven Membranfläche von 36 cm² pro Membranlage.

Es wurde ein HEPES/Imidazol-Puffer verwendet (ca. 40 mM HEPES/15 mM Imidazol, pH 7). Die Vorlagen für Konzentratlösung 2 und Elektroden-spüllösung 3 wurden mit jeweils 1000 mL Pufferlösung befüllt. Die Diluat-Vorlage wurde mit 400 mL im Puffer gelöstem HSA mit einer Konzentration von 38 g/L sowie IgG in einer Kon-

5 zentration von 4,5 g/L befüllt.

Restriktionsmembranen 14 mit einer nominalen Trenngrenze von 10 kDa sowie Separationsmembranen 15 mit einer nominalen Trenngrenze von 300 kDa wurden mit Standard-Spacern der Firma Goema zu einem Vierfach-Stack zusammengefügt. Bei

10 den verwendeten Membranen handelte es sich um PES-Ultrafiltrationsmembranen der Firma Sartorius.

Der Versuch wurde bei einer Stromdichte von etwa 45 A/m² durchgeführt, wobei an die diluatseitige Elektrode 20 ein negatives Potential angelegt wurde. Die Volumen-

15 ströme im Diluat- und Konzentratkreislauf betrugen jeweils 320 mL/min, der Volumenstrom im Elektrodenkreislauf 700 mL/min. Die Proteinkonzentrationen wurden durch HPLC-Analytik bestimmt.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

20 1a) Elektrophorese mit Kompensation des elektroosmotischen Flusses durch Regelung des Füllstands der Diluatvorlage mittels Druckbeaufschlagung

1b) Elektrophorese ohne Kompensation des elektroosmotischen Flusses

25 Tabelle 1 enthält Versuchsparameter und Konzentrationsverläufe des Versuchs 1a, Tabelle 2 die Daten des Versuchs 1b. Versuch 1b musste nach 180 Minuten abgebrochen werden, da die Diluatvorlage vollgelaufen war.

Die Abnahme der Albumin-Konzentration im Diluat ist konzentrationsabhängig und

30 folgt einer Kinetik erster Ordnung der Form:

$$\frac{dc}{dt} \cdot \frac{V}{A} = -k \cdot c$$

mit	c:	Albumin-Konzentration im Diluat	[g/L]
	t:	Zeit	[h]
	V:	Volumen Diluat	[L]
5	A:	Effektive Fläche der Separationsmembranen	[m ²]
	k:	Geschwindigkeitskonstante	[L/(h m ²)]

Durch Integration und Auflösung nach dem Restanteil erhält man:

$$\frac{c}{c_0} \cdot \frac{V}{A} = -k \cdot t$$

10	mit	c/c ₀ :	Restanteil	[-]
----	-----	--------------------	------------	-----

Berücksichtigt man, dass das Diluat-Volumen nicht unbedingt konstant bleibt, so kann man durch Einsetzen der Proteinmassen anstelle der Konzentrationen eine effektive Geschwindigkeitskonstante berechnen:

$$\frac{m}{m_0} \cdot \frac{V}{A} = -k_{\text{eff}} \cdot t$$

mit	m:	Albumin-Masse im Diluat	[g]
	m ₀ :	Albumin-Masse im Diluat zu Versuchsbeginn	[g]
	m/m ₀ :	massenbezogener Restanteil	[-]
20	k _{eff} :	effektive Geschwindigkeitskonstante	[L/(h m ²)]

Für die Abreicherung von Serumalbumin ergeben sich nach 180 Minuten massenbezogene Restanteile von 0,45 (Versuch 1a) beziehungsweise 0,64 (Versuch 1b). Setzt man diese in die oben beschriebene Formel ein, so ergibt sich für Beispiel 1a im Vergleich zu Beispiel 1b eine 1,8fache effektive Geschwindigkeitskonstante. Die Abreicherung erfolgt bei Druckkompensation also annähernd doppelt so schnell.

25

Die Selektivität der Abreicherung berechnet sich wie folgt:

$$\Psi = \frac{\ln [m/m_0 (\text{HSA})]}{\ln [m/m_0 (\text{IgG})]}$$

mit Ψ : Selektivität [-]
 $m/m_0 (\text{HSA})$: massenbezogener Restanteil des HSA im Diluat [-]
 $m/m_0 (\text{IgG})$: massenbezogener Restanteil des IgG im Diluat [-]

Über den gesamten Verlauf von Versuch 1a ergibt sich eine Selektivität von 8,8, während bei Versuch 1b lediglich eine Selektivität von 3,8 erzielt werden konnte.

Beispiel 2:

Die in Figur 1 gezeigte Anlage sowie das in Figur 2 skizzierte Modul 7a wurden für die Trennung von humanem Serumalbumin und Hämoglobin eingesetzt. Bei dem Modul 7a handelte es sich um ein modifiziertes Elektrodialysem modul der Firma Goema mit einer effektiven Membranfläche von 36 cm² pro Membranlage.

Es wurde ein 50 millimolarer MES/Histidin-Puffer verwendet (ca. 15 mM MES/35 mM Histidin, pH 6,5). Die Vorlagen für Konzentratlösung 2 und Elektrodenspüllösung 3 wurden mit 1 L beziehungsweise 800 mL Pufferlösung befüllt. Die Diluat-Vorlage 1 enthielt die beiden im Puffer gelösten Proteine mit Massenkonzentrationen von 4,5 g/L humanem Serumalbumin und 0,85 g/L Hämoglobin. Das Volumen der Diluat-Flüssigkeit betrug 400 mL und wurde während des Versuchs mittels Drucküberlagerung konstant gehalten.

Restriktionsmembranen 14 mit einer nominalen Trenngrenze von 10 kDa sowie Separationsmembranen 15 mit einer nominalen Trenngrenze von 300 kDa wurden mit Standard-Spacern der Firma Goema zu einem Vierfach-Stack zusammengefügt. Bei den verwendeten Membranen handelte es sich um PES-Ultrafiltrationsmembranen der Firma Sartorius.

Der Versuch wurde bei einer Stromdichte von 45 A/m^2 durchgeführt, wobei an die diluatseitige Elektrode 20 ein negatives Potential angelegt wurde. Die Volumenströme im Diluat- und Konzentratkreislauf betrugen jeweils 160 mL/min , der Volumenstrom im Elektrodenkreislauf 770 mL/min . Die Proteinkonzentrationen wurden durch HPLC-Analytik bestimmt. Die Füllstände in den Vorlagegefäßen wurden durch eine konzentratseitige Druckregelung konstant gehalten.

Nach 3 h. wurde eine 92 %ige Abreicherung des humanen Serumalbumins im Diluat bei 83 % Hämoglobin-Ausbeute im Diluat erzielt. Der Versuchsverlauf ist in Tabelle 3 abgebildet.

Tabelle 1: Ergebnisse HSA/IgG-Trennung (Beispiel 1a).

Zeit / min	Gasdruck / kPa (Diluatraum)	Volumen / mL (Diluat)	Stromdichte / A/m^2	m (HSA) / g (Diluat)	m (IgG) / g (Diluat)
0	0	439	45	14,3	1,6
30	0	451	47	12,5	1,6
60	9	451	47	10,9	1,5
90	14	462	45	10,0	1,5
120	15	462	45	8,6	1,4
150	18	466	42	7,5	1,3
180	20	474	50	6,5	1,3
210	21	474	45	5,7	1,3
240	20	474	45	4,9	1,3
270	23	482	42	4,2	1,3
300	24	466	45	3,3	1,4
330	21	474	42	2,7	1,3
360	22	462	42	2,4	1,3

Tabelle 2: Ergebnisse HSA/IgG-Trennung (Beispiel 1b).

Zeit / min	Gasdruck / kPa (Diluatraum)	Volumen / mL (Diluat)	Stromdichte / A/m ²	m (HSA) / g (Diluat)	m (IgG) / g (Diluat)
0	0	423	45	13,8	1,8
30	0	470	42	12,9	1,6
60	0	520	45	11,5	1,3
90	0	602	40	10,2	1,5
120	0	684	42	9,3	1,2
150	0	750	42	9,7	1,7
180	0	820	42	8,8	1,6

5 **Tabelle 3:** Ergebnisse HSA/Hämoglobin-Trennung (Beispiel 2)

Zeit / min	Gasdruck / kPa (Diluatraum)	Volumen / mL (Diluat)	Stromdichte / A/m ²	m (HSA) / g (Diluat)	m (Häm) / g (Diluat)
0	0	420	45	1,85	0,35
30	4	420	45	1,29	0,34
60	6	420	47	0,79	0,32
90	3	420	45	0,48	0,31
120	5	420	45	0,30	0,30
150	3	420	45	0,20	0,29
180	7	420	42	0,14	0,29

Patentansprüche

1. Verfahren zur Membranelektrophorese von gelösten oder dispergierten Substanzen in elektrolythaltiger Lösung unter Verwendung einer mindestens vier-
5 teiligen Trennkammer (7), die mindestens je einen Diluatraum (16), einen Konzentratraum (17), sowie einen Kathodenraum (18) und einen Anodenraum (21) mit Elektroden als Anode (19) bzw. Kathode (20) aufweist, wobei die einzelnen Räume durch poröse Membranen, insbesondere Ultra- oder Mikrofiltrationsmembranen (14, 15) voneinander getrennt sind und die Elektroden (19, 20) von Elektrodenspüllösung umspült werden und das Diluat kontinuierlich durch den Diluatraum (16), bzw. das Konzentrat kontinuierlich durch den Konzentratraum (17) geführt werden, dadurch gekennzeichnet, dass
10 mindestens eine im Diluat gelöste oder dispergierte Substanz mittels eines zwischen Anode (19) und Kathode (20) angelegten elektrischen Feldes elektrophoretisch vom Diluatraum (16) zum Konzentratraum (17) überführt wird, wobei zwischen dem Diluatraum (16) und dem Konzentratraum (17) eine Druckdifferenz von mindestens 3 kPa eingestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Druckdifferenz
20 zwischen Diluatraum (16) und Konzentratzzone so eingestellt wird, dass ein Flüssigkeitsstrom durch die Separationsmembran (15), die Konzentratraum (17) und Diluatraum (16) voneinander trennt, im Wesentlichen unterbunden wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Ver-
25 fahren in einer Trennkammer (7a) durchgeführt wird, die aus jeweils mehreren Diluaträumen (16a, 16b,...) und Konzentraträumen (17a, 17b) besteht, wobei die Diluaträume (16a, 16b,...) und Konzentraträume (17a, 17b,...) zwischen Anodenraum (21) und Kathodenraum (18) alternierend angeordnet
30 sind, die durch Ultra- und/oder Mikrofiltrations-Membranen (14a, 15a) von-

einander getrennt sind und parallel und/oder in Reihe verbunden betrieben werden.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Diluatflüssigkeit, Konzentratflüssigkeit und Elektroden-spüllösung oder einzelne dieser Lösungen unabhängig voneinander temperiert, bevorzugt gekühlt werden.
5
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Membranen eine Porengröße von 1 bis 1000 nm aufweisen.
10
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Membranen auf einem der folgenden Werkstoffe basieren: Celluloseester, Polyacrylnitril, Polyamid, Polyether, Polyethersulfon, Polypropylen, Polysulfon, Polyvinylalkohol, Polyvinylidenfluorid, oder Aluminiumoxid, Siliciumoxid, Titanoxid, Zirkonoxid sowie Mischkeramiken aus den oben genannten Oxiden.
15
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Anodenraum (21) und Kathodenraum (18) unabhängig voneinander mit Elektroden-spüllösung durchspült werden.
20
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die für die Diluatlösung, die Konzentratlösung und Elektroden-spüllösung verwendeten Elektrolyte eine Kombination aus schwachen Säuren und schwachen Basen, schwachen Säuren und starken Basen oder starken Säuren und schwachen Basen enthalten.
25
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrolyte eine oder mehrere der folgenden Verbindungen enthalten: Borsäure, Phosphorsäure, N-2-(Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure, N-2-(Acetamido)imino-diessigsäure, Alanin, 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol, Ammoniak, N,N-
30

Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin, 2,2-Bis(hydroxyethyl)-iminotris(hydroxymethyl)methan, 2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure, Essigsäure, Glycin, Glycylglycin, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl]ethansulfonsäure, 3-[4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl]propansulfonsäure, Histidin, Imidazol, Milchsäure, 2-Morpholinoethansulfonsäure, 2-Morpholinopropansulfonsäure, Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure), N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure, N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin, Triethanolamin, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Zitronensäure.

10

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Stromdichte bezogen auf die Membranfläche 10 bis 1000 A/m², bevorzugt 10 bis 250 A/m² beträgt.

15

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Leitfähigkeit der Diluatlösung 0,1 mS/cm bis 40 mS/cm, bevorzugt 0,1 bis 10 mS/cm, beträgt.

20

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Leitfähigkeit der Diluatlösung während der Trennung abgesenkt wird.

25

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Diluatlösung im Anschluss an die Trennung aufkonzentriert wird, insbesondere durch Kombination mit einer Flüssigpermeation, wie zum Beispiel Mikrofiltration, Ultrafiltration, Nanofiltration oder Umkehrosmose und dem Diluatraum (16) wieder zugeführt wird.

30

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine oder mehrere der folgenden Substanzen behandelt werden: Proteine, Peptide,

DNA, RNA, Oligonucleotide, Oligo- und Polysaccharide, Viren, Virenbestandteile, Zellen, Zellenbestandteile, Enantiomere und Diastereomere.

- 5 15. Vorrichtung zur Membranelektrophorese mindestens umfassend eine wenigstens vierteilige Trennkammer (7), die mindestens einen Diluatraum (16), einen Konzentratrium (17), sowie einen Kathodenraum (18) und einen Anodenraum (21) mit Elektroden als Anode (19) bzw. Kathode (20) aufweist, wobei die einzelnen Räume (16, 17, 18, 21) durch poröse Membranen (14, 15), insbesondere durch Ultra- oder Mikrofiltrationsmembranen (14, 15) voneinander getrennt sind, Zuleitungen (22) und Ableitungen (23) für das Diluat, Zuleitungen (24) und Ableitungen (25) für das Konzentrat, ggf. Zuleitungen (26) und Ableitungen (27) für die Elektroden-spüllösung sowie eine Einrichtung (8; 10) bzw. (9; 11) zur Druckregelung, mittels der zwischen Diluatraum (16) und Konzentratrium (17) eine Druckdifferenz insbesondere von mindestens 3 kPa erzeugbar ist.
- 10 16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennkammer (7) in mehrere Diluaträume (16a, 16b) und Konzentratrium (17a, 17b) unterteilt ist.
- 15 17. Vorrichtung nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen Anodenraum (21) und Kathodenraum (18) alternierend mehrere Diluaträume (16a, 16b) und Konzentratrium (17a, 17b) angeordnet sind, die durch poröse Restriktionsmembranen (14a, 14b) bzw. Separationsmembranen (15a, 15b) voneinander getrennt sind und die bevorzugt parallel und/oder in Reihe geschaltet sind.
- 20 18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass Zuleitungen (22) und Ableitungen (23) für das Diluat in einem Diluatkreislauf (1; 4; 22; 23), Zuleitungen (24) und Ableitungen (25) für das Konzentrat in einem Konzentratkreislauf (2; 5; 24; 25), ggf. Zuleitungen (26) und
- 25 30

Ableitungen (27) für die Elektrodenspüllösung in einem Elektrodenspülungskreislauf (3; 6; 26; 27) angeordnet sind.

- 5 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Diluatkreislauf, Konzentratkreislauf und Elektrodenspülungskreislauf aufweist und insbesondere Wärmetauscher in einzelnen oder allen dieser Kreisläufe aufweist.
- 10 20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass poröse Membranen mit einer Porengröße von 1 bis 1000 nm vorgesehen sind. Diese sind bevorzugt aus organischen oder anorganischen Materialien oder einer Mischung aus beiden hergestellt.
- 15 21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Membranen auf einem der Werkstoffe basieren ausgewählt aus der Reihe:
Celluloseester, Polyacrylnitril, Polyamid, Polyether, Polyethersulfon, Polypropylen, Polysulfon, Polyvinylalkohol, Polyvinylidenfluorid, oder aus Aluminiumoxid, Siliciumoxid, Titanoxid, Zirkonoxid sowie Mischkeramiken aus den oben genannten Oxiden.
- 20 22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Elektrodenspülungskreislauf durch einen getrennten Anodenspülkreislauf und Kathodenspülkreislauf gebildet ist.
- 25

Vorrichtung und Verfahren zur präparativen Elektrophorese

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wird ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung der Membranelektrophorese mittels Mikro- oder Ultrafiltrationsmembranen beschrieben. Dabei wird der elektroosmotische Fluss, der sich in den Membranporen ausbildet, durch Drucküberlagerung reduziert oder kompensiert. Die Vorrichtung zur Membranelektrophorese umfasst mindestens eine wenigstens vierteilige Trennkammer (7), die mindestens einen Diluatraum (16), einen Konzentratraum (17), sowie einen Kathodenraum (18) und einen Anodenraum (21) mit Elektroden als Anode (19) bzw. Kathode (20) aufweist, wobei die einzelnen Räume (16, 17, 18, 21) durch poröse Membranen (14, 15), insbesondere durch Ultra- oder Mikrofiltrationsmembranen (14, 15) voneinander getrennt sind, Zuleitungen (22) und Ableitungen (23) für das Diluat, Zuleitungen (24) und Ableitungen (25) für das Konzentrat, ggf. Zuleitungen (26) und Ableitungen (27) für die Elektroden-spüllösung sowie eine Einrichtung (8; 10) bzw. (9; 11) zur Druckregelung, mittels der zwischen Diluatraum (16) und Konzentratraum (17) eine Druckdifferenz insbesondere von mindestens 3 kPa erzeugbar ist.

(Fig. 1)

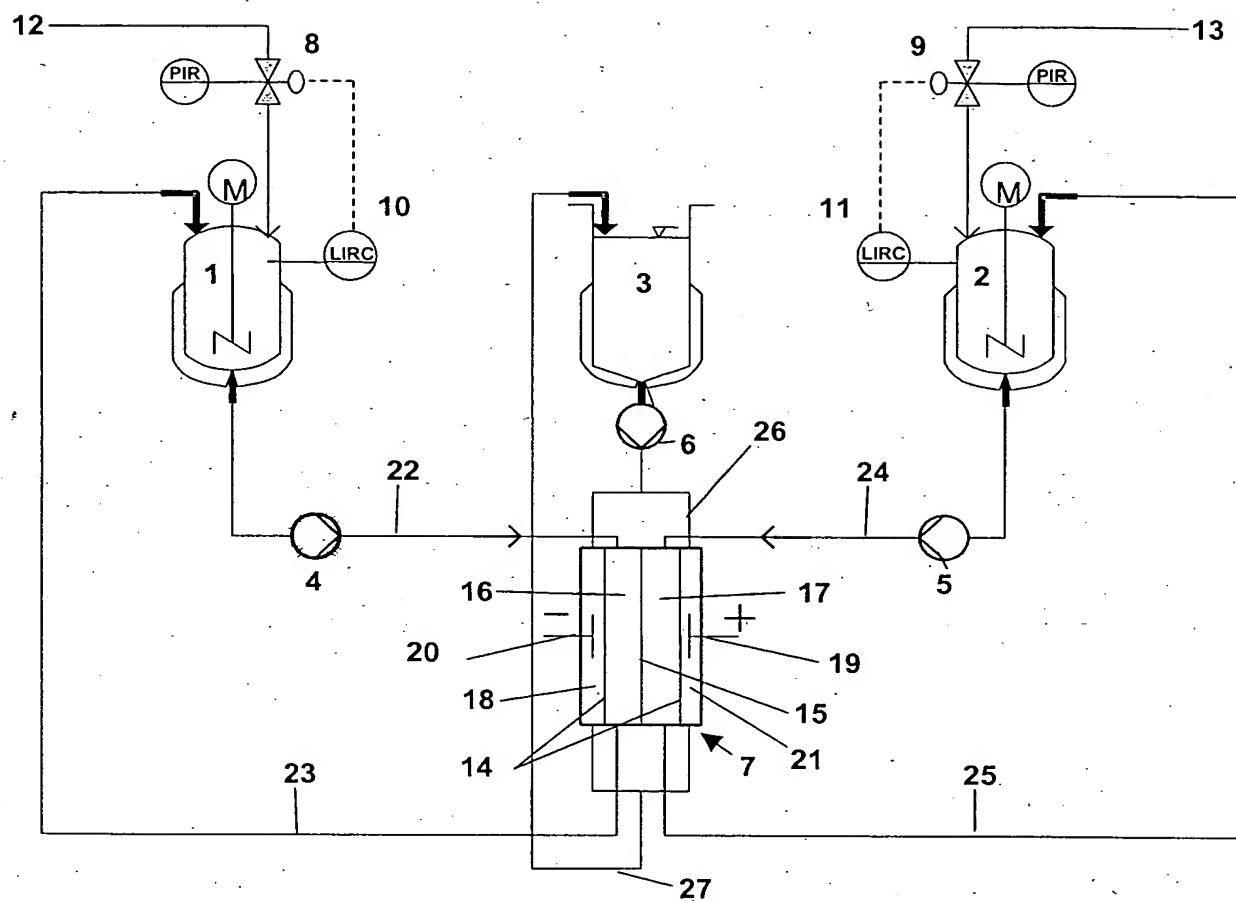


Fig. 1

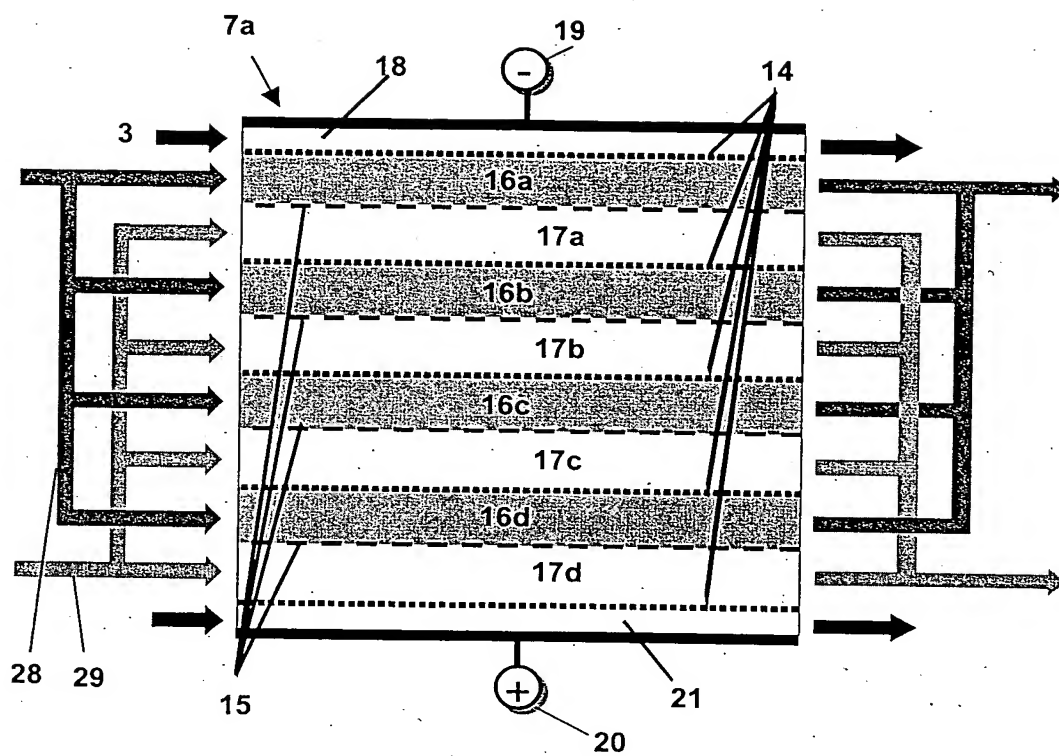


Fig. 2